



REHIDRATACIÓN DE LEVADURAS SECAS ACTIVAS. EFECTOS DE LA GLUCOSA EN LA SOLUCIÓN DE REHIDRATACIÓN

AUTOR: Patiño, Claudia Elizabeth

LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Luján de Cuyo, Chacras de Coria; Marzo 2017

REHIDRATACIÓN DE LEVADURAS SECAS ACTIVAS. EFECTOS DE LA GLUCOSA EN LA SOLUCIÓN DE REHIDRATACIÓN.

AUTOR: Claudia Elizabeth Patiño;

Contacto: claudiabob21@hotmail.com

DIRECTORA: MSc Ing Agr. Silvia Paladino

CODIRECTORA: MSc Lic. Ma. Laura Sánchez

COMITÉ EVALUADOR:

Presidente: Ing. Agr. Cora Dediol

Vocales: MSc Ing. Marcos MAZA

Ing. Agr. Carolina PEREIRA

RESUMEN

El proceso de rehidratación de las levaduras secas activas consiste en reincorporar el agua perdida durante la desecación industrial. Esta etapa es fundamental para que las células vuelvan a ser funcionales y fermenten los azúcares del mosto de manera eficaz. Permite a la célula recuperar su actividad metabólica así como su funcionalidad de sus membranas, facilitando un rápido inicio de la fermentación alcohólica. Una adecuada rehidratación, minimizando los daños a nivel de membrana plasmática así como la pérdida de componentes intracelulares repercutirá en la viabilidad y la vitalidad de las células.

La Glucosa tiene un efecto estabilizador sobre las membranas durante la rehidratación, también puede penetrar en la célula y estimular la formación de redes proteicas que impiden la difusión de sustancias intracelulares. Por otra parte, a altas temperaturas, la glucosa, puede acelerar las reacciones entre azúcares y aminos, esto produce un incremento en la permeabilidad de la célula.

El objeto de este trabajo es evaluar el uso de glucosa durante el proceso de rehidratación de las levaduras secas activas y su efecto sobre la población de levaduras obtenidas y la velocidad de fermentación del jugo de uva. Se realizó el experimento con 3 tratamientos de diferentes concentraciones de glucosa: Testigo 0 g/l (T1); 100 (T2) y 250 (T3) g/l, cada uno por triplicado, a los que se le analizó pérdida de CO₂, recuento de células viables, densidad óptica y peso seco, obteniendo como resultado, en las condiciones en las que se realizó el experimento que no es necesario, el agregado de azúcar al agua de rehidratación.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, hermano y tía, por su amor y apoyo constante.

A Sebastián, por su paciencia, compañía, aliento y motivación para seguir adelante.

A Silvia Paladino y Ma. Laura Sánchez por su tiempo, dedicación y por brindarme sus conocimientos.

A todas aquellas personas que por breves o largos momentos tuvieron que ver para que hoy esté aquí.

Quiero dedicar mi tesis, a una de las personas más importantes, a mi papá, que no está a mi lado físicamente.

INDICE

1- Introducción	Pág. 1
2- Las levaduras	
2.1- Características generales	2
2.2- Especies de mayor relevancia enológica	2
2.3- Vinificación con levaduras seleccionadas	3
2.4- Producción de levaduras secas activas	6
2.5- Deshidratación de la biomasa	8
2.6- Reconstitución celular: rehidratación	9
2.7- Parámetros que definen el estado de las levaduras durante el proceso fermentativo	11
2.8- Vitalidad, viabilidad y cinética de fermentación	11
2.9- Relación entre el consumo de Glucosa y Fructuosa en levaduras	13
2.10- Ventajas de utilización de levaduras seleccionadas	15
3- Hipótesis del trabajo	17
3.1 Objetivos	17
4- Materiales y métodos	
4.1- Tratamientos	18
4.2- Microorganismos utilizados	18
4.3- Procedencia del jugo de uva	18
4.4- Preparación del trabajo	
4.4.1- Cinética de fermentación	19
4.4.2- Control de población viable	20
4.4.2.1- Recuento de microorganismos	20
4.4.2.2- Peso seco	20
4.4.2.4- Determinación de la biomasa por espectrofotometría	21
5- Resultados y discusión	22
6- Conclusiones	32
7- Bibliografía	33

1. INTRODUCCIÓN

La obtención de vino a partir de mosto de uva es un proceso microbiológico complejo que implica la participación de diferentes microorganismos como levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Fleet, 1993). La fermentación alcohólica es una de las principales etapas de este proceso y consiste en la transformación de la glucosa y fructosa presentes en el mosto en etanol y CO₂ mayoritariamente, junto con la aparición de otros subproductos muy importantes para la calidad del vino, como son los ésteres y los alcoholes superiores. Esta conversión es llevada a cabo generalmente por cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Frente a fermentaciones espontáneas, el uso de inóculos de cepas seleccionadas es un procedimiento frecuente en bodega. Aunque durante las primeras fases las cepas autóctonas pueden tener importantes efectos en el aroma (Querol, 1992), la cepa inoculada es responsable de la fermentación y constituye la mayor parte de la población de levaduras al final del proceso (Boulton, 1996). Esta estrategia de inoculación de cultivos iniciadores proporciona ventajas tales como un acortamiento de la fase de latencia, una reducción significativa de la influencia de cepas salvajes de levadura, una fermentación rápida y completa del mosto y la posibilidad de reproducir las características y la calidad del vino (Bauer, 2000; Fleet 1993)

2. Las levaduras

2.1 Características generales

Las levaduras son hongos unicelulares pertenecientes en su mayor parte al grupo Ascomycotina, es decir, al grupo de hongos capaces de formar esporas contenidas en el interior de un asco. Llegan a la uva por el viento y los insectos siendo retenidas en la pruina, una sustancia cerosa que recubre la piel de la uva. De ahí pasan al mosto cuando se rompe el grano de uva en las operaciones enológicas de estrujado y prensado (Alegre, 1999).

Vistas al microscopio las distintas especies presentan formas muy variadas. Las hay elípticas, como las especies del género *Saccharomyces*; esféricas como *Torula*; alargadas como *Torulopsis stellata*, y apiculadas como *Hanseniaspora* (Barnett, 1990). Su morfología es uno de los caracteres utilizados en su clasificación, como también lo son entre otros su forma de reproducción y sus características bioquímicas (Lambrese, 2012).

Se reproducen de manera sexual, generando esporas o asexual por gemación o fisión. (Alegre, 1999).

2.2 Especies de mayor relevancia enológica

Manteniendo la distinción hecha entre levaduras esporógenas y asporógenas (Navarre, 1994), a continuación se detallan algunas de las especies con mayor relevancia enológica.

Entre las levaduras esporógenas, denominadas frecuentemente de segunda fase por aparecer en un estado avanzado de la fermentación alcohólica y producir gran cantidad de etanol, se destacan:

Saccharomyces cerevisiae es una de las más importantes en enología ya que es la responsable de la fermentación de la mayor parte de los azúcares del mosto. Su poder alcohólico es elevado 15-16° y es bastante resistente al SO₂ libre (250 mg/L).

Saccharomyces bayanus, semejante a la anterior, resiste también 250 mg de SO₂/L, pero su poder alcohólico es mayor pudiendo superar los 16-17°. Es la levadura típica de las etapas finales de la fermentación y a menudo la responsable de refermentaciones de vinos y espumantes.

Saccharomyces acidifaciens, con un poder alcohólico de tan solo 10°, su principal característica es su elevada resistencia al SO₂ (250 a 400 mg/L) lo que le permite iniciar la fermentación en mostos muy sulfitados, comportándose en estos casos como levadura de primera fase.

Torulaspora rosei tiene un poder alcohólico de 8 a 14° y su principal característica es su capacidad para fermentar lentamente los azúcares con lo que los niveles de acidez volátil producidos son menores.

Entre las levaduras asporógenas, generalmente de primera fase, que se caracterizan por aparecer al principio de la fermentación alcohólica y producir gran cantidad de compuestos secundarios enriquecedores del sabor y aroma del vino, se destacan:

Kloeckera apiculata, es la forma imperfecta o haploide de *Hanseniaspora uvarum*. Junto con *S. cerevisiae* es la levadura más frecuentemente encontrada en los mostos. Su poder alcohólico es muy bajo (4-5°) y también lo es su rendimiento en alcohol, necesita fermentar de 21 a 22 gramos de azúcar para obtener 1% de etanol. Produce mucha acidez volátil por lo que no es deseable en las fermentaciones. Se la elimina fácilmente con el sulfitado dada su baja resistencia al mismo.

Candida stellata tiene un poder alcohólico de 10 a 11° y se caracteriza fundamentalmente por aparecer con más frecuencia en mostos de uvas atacadas de podredumbre.

En fermentaciones espontáneas, las especies de *Saccharomyces* acaban sustituyendo al resto de los microorganismos en el caldo de cultivo y son las que completan la fermentación (Zuzuarregui, A 2005), esto se debe a que las características físico-químicas del mosto como su alto contenido de azúcar, pH bajo y la presencia de SO₂ ejercen presión positiva y selectiva sobre esta especie, haciendo posible que domine la fermentación (Mercado, 2007)

2.3 Vinificación con levaduras seleccionadas

Algunos viticultores y enólogos defienden que las fermentaciones espontáneas permiten obtener un vino con estilo y calidad distintivos, y que la mezcla de diferentes poblaciones de levadura permite no sólo la transformación del azúcar en alcohol sino la obtención de otros metabolitos finales que aportan al vino mayor complejidad. Sin

embargo en ocasiones ésta biodiversidad de levaduras da lugar a fermentaciones lentas e incluso paradas de la fermentación. Hoy en día, se ha comprobado que el uso de levaduras seleccionadas tiene importantes ventajas con respecto a la fermentación espontánea tradicional, y que la presencia de un número pequeño de cepas dominantes da como consecuencia una fermentación rápida y completa (Riberau – Gayon y col, 2001). También es importante el uso de LSA porque las fermentaciones se transforman así en procesos más gobernables y predecibles.

Durante años las levaduras han sido objeto de estudios y selección en función de criterios de mejora de la calidad del vino para conseguir productos tipificados por regiones.

Las investigaciones relacionadas a la selección de levaduras se basan en conocer el comportamiento de las mismas, evaluar si se ajustan a las necesidades tecnológicas de vinificación, y lograr hacer un proceso predecible y seguro. En consecuencia el uso de levaduras aisladas seleccionados disminuye la variabilidad en la calidad de los vinos año tras año (Mas, 2006)

La selección de una cepa de levadura local, contribuiría a lograr el mantenimiento de las propiedades típicas de los vinos producidos en una región dada. Su utilización como microorganismos iniciadores minimiza fluctuaciones en la calidad del producto final debido a factores ambientales que condicionan la microbiota levaduriana presente en la uva. Es por esto que la inoculación resulta ser una valiosa herramienta para la diferenciación y preservación del vino, a la vez que protege a la biodiversidad microbiana propia de cada ecosistema vitícola (Combina, 2005).

Esto supone una perfecta adaptación a la materia prima, tanto por sus características fermentativas como por la expresión de la especificidad de los caracteres para los cuales ha sido seleccionada (Mas, 2006; Trione, 1989); la práctica recomienda recurrir a levaduras autóctonas, las cuales están mejor aclimatadas a las condiciones de producción locales (Llanos, 2003).

Cuando una levadura local seleccionada es inoculada en un mosto recién obtenido, se convierte en el agente dominante de esa fermentación, dejando en menor número a aquellas que provienen de la materia prima y demás instalaciones (Melero 1992 y Fleet, 1993). A pesar de esta situación, no se descarta la contribución de las levaduras silvestres en cuanto al sabor y aroma de los vinos (Heard, 1985; Reed 1988;

Mora, 1990; Lema, 1996; Gil, 1996), siendo además que la mayoría de los aromas secundarios son aportados por la cepa inoculada.

Según la levadura empleada en la fermentación del mosto, se producirán compuestos volátiles y no volátiles como consecuencia de su metabolismo. Estas diferencias serán definidas a partir de las evaluaciones sensoriales. (Heard, 1986). La cantidad producida de estos compuestos depende de los factores intrínsecos del mosto (composición química, temperatura, aireación, pH, etc.) y de factores genéticos específicos de la levadura. Esta fuerte correlación, existente entre los metabolitos producidos durante la fermentación y la levadura utilizada, ha conducido a la selección y utilización de aquellas cepas que producen un aroma y sabor más agradable (Regodon, 2004).

Por lo tanto, aunque existen levaduras secas activas (LSA) comerciales teóricamente apropiadas para realizar vinificaciones, resulta mucho más adecuado utilizar cepas autóctonas (locales) seleccionadas (Suárez, 1992; Querol 1992b; Melero, 1992; Degré, 1993; Castino, 1994 y Lema, 1994). Las cepas locales están mejor aclimatadas a las condiciones geo-botánico-climatológicas de la zona productora en cuestión, y pueden implantarse como agente biológico más importante responsable de la fermentación alcohólica, aún en presencia de las levaduras silvestres que se encuentran en los mostos no estériles. Por otra parte, la utilización de microorganismos locales seleccionados puede asegurar el mantenimiento de las características propias típicas de los vinos de la zona, aspecto muy importante a considerar por el industrial bodeguero que comercializa la mayoría de su producción en origen. Las cátedras de Microbiología, Enología I y II, de la Facultad de Ciencias Agrarias, cuentan con una selección de levaduras vínicas con más de 400 cepas. Estudios anteriores permitieron la formación de una colección mediante el aislamiento, selección y multiplicación de individuos provenientes de diversos viñedos de departamentos vitivinícolas importantes de la Provincia de Mendoza (Formento, 2011; Sanchez, 2010; Formento, 2009; Días Peralta, 2007; Formento, 2006). Bernardi en 2013 permitió acabar un estudio en cuanto a las características tecnológicas y cualitativas de manera representativa de cepas que conforman la colección de la FCA, concluyendo que las levaduras seleccionadas a partir de una determinada zona de producción, podrían ser una buena solución para mantener las características propias de los vinos de una región vitivinícola, minimizando la pérdida de tipicidad de los vinos inoculados; aportando una

característica económicamente competitiva y ayudando también en la conservación de la biodiversidad.

2.4 Producción de levaduras secas activas

La adecuada producción industrial de los cultivos puros es crucial para asegurar la pureza y la estabilidad de las características por las que se seleccionaron.

Para la propagación de las levaduras se utiliza un medio que contiene melaza que además de ser rico en fuente de carbono, es económico, un factor relevante en los procesos industriales. La melaza es el subproducto de desecho mayoritario de las plantas de refinamiento de azúcar a partir de remolacha o de caña de azúcar. El uso de una u otra melaza depende prácticamente de su disponibilidad y precio en el mercado, siendo habitual el uso de melazas producidas en la misma región o regiones cercanas. El principal azúcar presente en las melazas es la sacarosa (50 – 65%), que es fácilmente asimilable por *Saccharomyces cerevisiae* gracias a que posee una elevada actividad invertasa que le permite una rápida hidrólisis en glucosa y fructuosa. En cambio, las melazas no resultan una buena fuente de nitrógeno, de fósforo ni de magnesio, siendo necesario adicionarlos normalmente en forma de sales de amonio, urea, ácido fosfórico y sulfato de magnesio. También es necesario suplementarlas con vitaminas, principalmente biotina (Ough, 1992) (ya que las levaduras son incapaces de sintetizarla), tiamina y ácido pantoténico. La carencia de este último está relacionada con la formación de compuestos no deseables como el ácido acético y el sulfuro de hidrógeno (Wang, 2003; Aranda, 2005). Hay que tener en cuenta que al tratarse de un subproducto de otra actividad industrial, estas melazas no suelen estar sometidas a controles y procesos de estandarización por lo que es posible hallar compuestos tóxicos capaces de inhibir el crecimiento de las levaduras como metales pesados, fertilizantes, insecticidas, herbicidas, nitritos y SO₂. En las empresas de producción de levaduras es habitual verificar la composición de cada lote y mezclar diferentes lotes para minimizar los posibles efectos negativos (Perez – Torrado, 2004; González, 2005). Otro factor importante es el pH de las melazas, que es necesario ajustar entre 4,5 y 5,0 para un crecimiento óptimo de las levaduras en este medio. Antes de suplementar y ajustar el pH de las melazas, estas son diluidas y sometidas a tratamientos de clarificación y esterilización, de esta forma pueden ser almacenadas, normalmente a 4°C, hasta su utilización (Degre, 1993)

La propagación de las levaduras (Figura 1) (Perez – Torrado, 2004) se inicia a partir de un crecimiento del cultivo puro a escala de laboratorio. A partir de él se inocula el primer fermentador de una secuencia de fermentaciones escalando a fermentadores de mayor volumen en cada paso. Las primeras fermentaciones se realizan en condiciones de *batch* (cultivo discontinuo, todos los componentes se añaden desde el principio y no se renuevan) permitiendo que las células consuman el etanol producido antes de ser inoculadas en la siguiente fermentación. El resto de las fermentaciones hasta llegar a la fermentación comercial se realizan en condiciones de *fed-batch* (la alimentación del cultivo se hace de forma controlada a lo largo del proceso), favoreciendo el metabolismo respiratorio que permite obtener un gran rendimiento en biomasa, ya que la oxidación de la glucosa durante la respiración genera un rendimiento energético por mol de azúcar consumido mayor que el obtenido mediante el metabolismo fermentativo. Al final del primer cultivo en *fed-batch*, las células pueden ser recogidas, lavadas y centrifugadas, la crema resultante es almacenada a 2-4°C hasta su uso como inóculo de la siguiente fermentación.

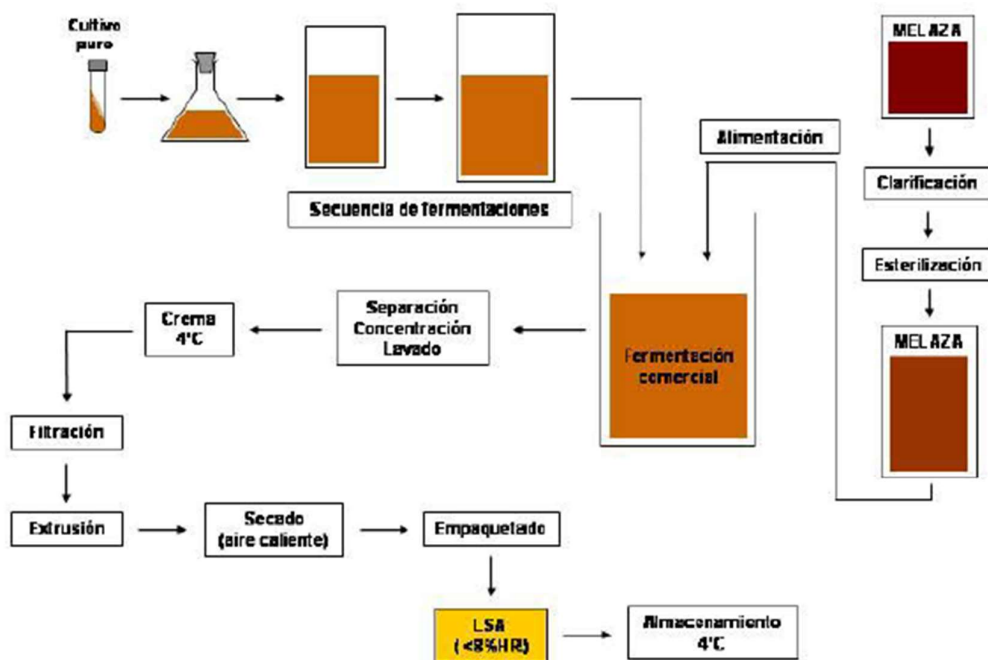


Figura 1: Proceso de obtención de LSA. “Rehidratación de levaduras vínicas con activadores metabólicos: influencia en la cinética fermentativa y fisiología molecular” Díaz Patiño, 2013

Una adecuada aireación durante la propagación de la biomasa en condiciones *fed-batch* es fundamental para alcanzar un buen rendimiento y calidad del producto. La disponibilidad de oxígeno es imprescindible para el consumo del azúcar a través de la respiración y minimizar el proceso fermentativo. También es necesaria para la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides, principalmente ergosterol ya que la carencia de estos compuestos afecta a la estructura y función de la membrana plasmática, limitando la capacidad de las levaduras para fermentar el mosto principalmente debido a la reducción de la tolerancia al etanol (Degre, 1993; González, 2005)

Para evitar el metabolismo fermentativo es necesario que la concentración de glucosa no supere los 9g/L (Garre, 2008), por encima de este umbral, aun en presencia de oxígeno, parte del azúcar se destina a la producción de etanol, fenómeno que se conoce como efecto *Crabtree*. Los elevados niveles de glucosa juegan un doble papel en este efecto. Por un lado, se genera una gran acumulación de piruvato intracelular a través de la glicolisis, debido a la saturación de las actividades piruvato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y acetil CoA sintasa, favoreciendo su degradación vía piruvato descarboxilasa (Frick y Wittman, 2005; González, 2005). Por otro ejercen una represión tanto a nivel de expresión genética como de inactivación enzimática sobre los componentes del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria (Aranda, 2005).

Al final de la obtención de biomasa, se lleva a cabo la etapa de maduración durante 1-2 horas. Se mantiene el cultivo sin alimentar asegurando que los sustratos son totalmente consumidos y las células terminan de dividirse entrando en fase estacionaria (Jorgensen, 2002). Esta etapa es importante para que la biomasa obtenida tenga activos sus mecanismos de respuesta al estrés y acumule metabolitos de reserva (glucógeno) y de protección (Trehalosa), para poder sobrevivir al proceso de secado y mantener una adecuada capacidad fermentativa tras la rehidratación.

2.5 Deshidratación de la biomasa

La biomasa obtenida tras la fermentación comercial es lavada, concentrada mediante centrifugación hasta obtener una crema de levadura libre de melaza (figura 1). Como se mencionó anteriormente, esta crema puede almacenarse a 4° con ajuste de pH a 3,5 para evitar contaminaciones por otros microorganismos.

La crema es filtrada en filtros rotativos al vacío o filtros prensa hasta conseguir una pasta con un 30-35% de materia seca. Seguidamente, esta pasta se divide en finos filamentos que facilitaran el posterior secado mediante extrusión a través de un plato perforado.

El secado es llevado a cabo con aire caliente hasta obtener una materia seca con menos de un 8% de humedad residual. Aunque existen varios tipos de deshidratadores, el más extendido es el de tipo lecho fluidificado. Este deshidratador hace circular aire caliente en forma continua a través de la masa permitiendo una rápida pérdida del agua y evitando que la temperatura de la levadura exceda 35-41°C, a lo largo del secado. La duración del proceso puede variar entre 15-60 minutos dependiendo del volumen de materia a secar y condiciones empleadas.

Finalmente, la levadura seca activa es empaquetada al vacío, en presencia de un gas inerte o de CO₂, con el fin de reducir la oxidación del producto. Se estima que la pérdida de viabilidad es entre el 10 y el 25% por año si se conserva a 20°C, por lo que los productores recomiendan un almacenamiento a 4°C y en un ambiente seco durante 3 años.

2.6 Reconstitución celular: rehidratación

En bodega solo se puede actuar en la rehidratación de las LSA, por ello un protocolo adecuado de revitalización – rehidratación es esencial ya que influirá en el proceso de vinificación, pudiendo evitar paradas o enlentecimientos fermentativos innecesarios, la aparición de aromas anómalos y/o cualquier parámetro directa o indirectamente relacionado con la población de levaduras.

En la rehidratación de las LSA las células recuperan el agua que perdieron durante la desecación industrial. Esta etapa es fundamental para que las células vuelvan a ser funcionales y fermenten los azúcares del mosto de manera eficaz. Permite a las células recuperar su actividad metabólica así como la funcionalidad de sus membranas, facilitando un rápido inicio de la fermentación alcohólica. Una adecuada rehidratación, minimizando los daños a nivel de membrana plasmática así como la pérdida de componentes intracelulares repercutirá en la viabilidad y la vitalidad de las células (Poirier y col, 1999).

Existen distintos tipos de protocolos de rehidratación celular. Monk en 1986 demostró que la rehidratación a 37–40 °C suponía una viabilidad que rondaba el 100 %

comparada con el 40 – 50 % que se alcanzaba a 15 °C, diferencia que se atribuyó al tiempo que necesitaba la membrana celular en recuperar su funcionalidad. A una temperatura óptima, el tiempo idóneo es 20 minutos, no debe exceder de 30 minutos (Fugelsang, 1997), ya que las células reactivadas comienzan a consumir los nutrientes acumulados, con el riesgo de que éstos se agoten y la consiguiente pérdida de actividad celular.

Algunos protocolos recomiendan el uso de mezclas de agua y azúcar o agua y mosto (1:1), aunque este último no es muy recomendable debido a la posible presencia de inhibidores (Garre, 2008).

Recuperada la fluidez de la membrana y antes de su inoculación, es necesario ajustar la temperatura de la suspensión mediante la adición de pequeñas cantidades de mosto, de modo que el salto térmico no sea superior a 10°C entre la levadura rehidratada y el mosto a fermentar. Impedir un shock térmico reduce la ocurrencia de mutaciones en la cepa seleccionada. Asimismo es recomendable que la temperatura del mosto no sea inferior a 18°C para evitar fases de latencias prolongadas (Suárez, 1997). Una fermentación efectiva requiere disponer de una población mínima inicial de $1 - 3 \times 10^6$ células viables /ml, debiéndose emplear para ello dosis de inóculo entre 20 – 40 gr/hL. Una densidad poblacional inferior aumentaría el periodo de latencia, favoreciendo el crecimiento de la microbiota competitiva (Fugelsang, 1997). En cuanto al estrés osmótico, existen varios momentos en los que las cepas deben tolerar aumentos en la osmolaridad del medio. Así, el crecimiento de las levaduras para su producción industrial se realiza en melazas que pueden tener concentraciones de sacarosa de aproximadamente un 50% (p/v). Aunque dichas melazas suelen ser diluidas alrededor de 10 veces, la concentración de azúcares es suficiente para generar cierto grado de estrés osmótico sobre la célula. Sin embargo, el punto crítico en cuanto a este tipo de estrés lo encontramos al inocular las levaduras en el mosto, donde se alcanzan concentraciones de azúcares entre el 15 y el 25% (p/v) (Zuzuarregui, 2005), por lo que es recomendable, agregar alícuotas de mosto al agua de rehidratación para minimizar el impacto del shock osmótico.

El proceso de deshidratación-rehidratación es traumático para la célula ya que pierde material vital, como nucleótidos, iones y algunos componentes celulares solubles (Rapoport y col, 1995); sin embargo, si las condiciones de crecimiento son

óptimas la mayoría de las células rehidratadas conservan su capacidad de reproducirse (Rodríguez Porrata, 2008).

Por último, un factor a considerar es el momento de la adición de LSA ya que ello permite minimizar los riesgos de un levadurado ineficaz habiendo enólogos que prefieren su adición al principio, mientras que otros optan por dejar un tiempo para el desarrollo de la microbiota espontánea.

2.7 Parámetros que definen el estado de las levaduras durante el proceso fermentativo

Para que una población de LSA se implante hay que conseguir un número suficiente de células vivas y adecuado estado fisiológico, de ocurrir esto repercutirá en el éxito de la fermentación alcohólica.

La viabilidad y vitalidad celular proporcionan una idea precisa de la fisiología celular; asimismo, los estudios de cinética también permiten evaluar el comportamiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica: la determinación de parámetros como la producción de CO₂, consumo de azúcares reductores, medida del área bajo la curva a un tiempo y temperatura prefijados, velocidad específica de crecimiento, tasa de producción de CO₂ (vitalidad), o la asíntota o valor máximo de la ordenada ayudan a definir la bondad de las levaduras.

2.8 Vitalidad, viabilidad y cinética de fermentación

La **vitalidad celular** se define como la capacidad para desprender CO₂ por unidad de tiempo en un momento determinado (Rodríguez Porrata y col, 2008).

El metabolismo microbiano utiliza nutrientes que son moléculas pequeñas como monosacáridos y aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno, dando lugar a compuestos ionizados de menor peso molecular. Éstos, o sus productos de disociación pueden alterar la conductividad de un líquido, lo cual provoca una variación en su resistencia eléctrica, o la inversa, denominada impedancia. El CO₂ producido por las células es absorbido por una disolución de hidróxido de potasio, produciéndose carbonato de potasio que aumenta la impedancia de la solución. Este parámetro permite determinar la microbiota de la muestra así como su nivel de actividad presente en ella.

La **viabilidad** del inóculo, definida como la capacidad de reproducción, depende de la cepa utilizada, del proceso al que fue sometida, del envasado, del tiempo y condiciones de almacenamiento, de la dosis de levadura seca (especialmente del proceso de rehidratación seguido) y está relacionada con parámetros propios del mosto como la presión osmótica, la temperatura y otros intrínsecos de la misma célula como su tasa de crecimiento (Baney, 2001).

Durante el crecimiento de una levadura en un proceso discontinuo se puede distinguir varias fases **Figura 2** (Walker, 1998)

Fase de latencia o periodo de adaptación de la levadura a un nuevo entorno (nutrientes, temperaturas, pH, etc.): durante esta fase, el número de células permanece constante, o incluso disminuye, su duración depende del tamaño del inóculo y del estado fisiológico de las levaduras.

Fase exponencial: representa un periodo de crecimiento logarítmico y constante. Se intensifica la actividad metabólica así como el número de divisiones celulares (mitosis), aumentando en progresión geométrica. Su duración depende de la especie de levadura y de las condiciones ambientales.

Fase estacionaria: se detiene el crecimiento por completo. Al agotarse los nutrientes, las levaduras comienzan a sintetizar metabolitos secundarios, alguno de los cuales pueden ser perjudiciales para la propia levadura. Al finalizar esta fase se produce la muerte y lisis celular y el número de individuos no viables supera a los viables se produce una disminución constante del número de células vivas hasta su total depresión.

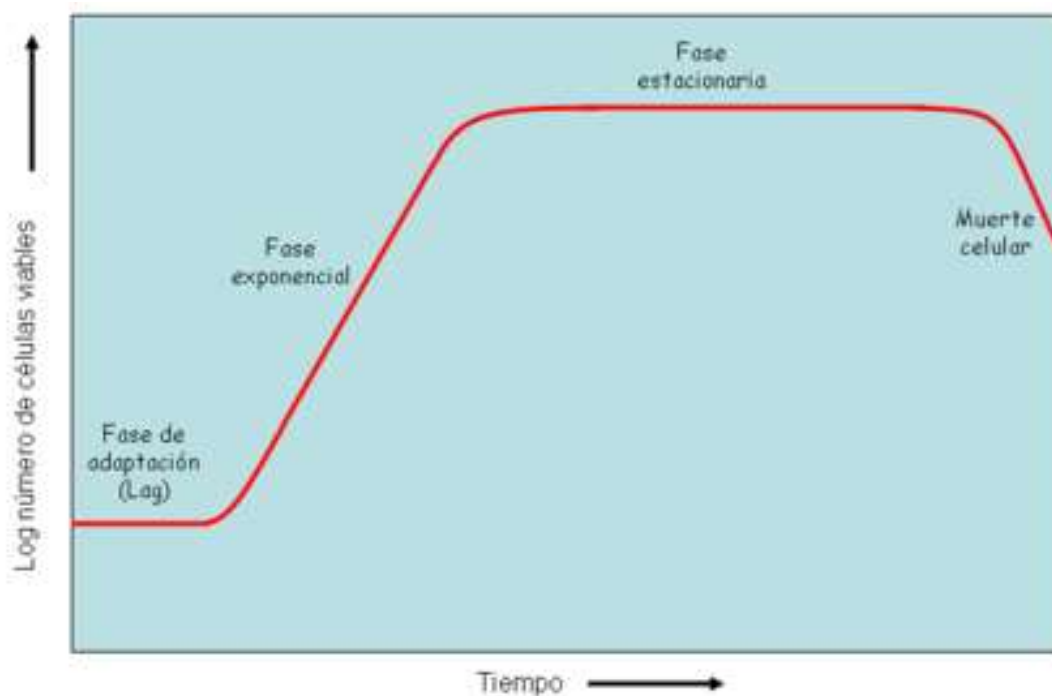


Figura N° 2: Curva de crecimiento microbiano (<https://es.slideshare.net/biologiaibc/nutricion-cultivo-y-crecimiento-microbiano>).

Pese a las buenas características de las LSA comerciales, su inoculación no garantiza su implantación durante la fermentación alcohólica, lo cual puede atribuirse a distintos factores como el choque térmico, estrés osmótico, rehidratación prolongada o la competencia que ejerce las cepas autóctonas, entre otros (Barrajón y col, 2009). También se comercializan activadores metabólicos, como factores de crecimiento, que optimizan a la multiplicación celular y, factores de supervivencia, que la levadura no es capaz de sintetizar en condiciones de anaerobiosis (Rodríguez – Porrata, 2010).

2.9 Relación entre el consumo de glucosa y fructosa en levaduras

El mosto de uva suele poseer cantidades equimolares de glucosa y fructosa (Flanzy y col, 2003), aunque este factor es dependiente de parámetros como el momento de vendimia o la climatología. En el envero, la concentración de glucosa en la uva es normalmente superior que la de fructosa (Bulton y col, 1996). Jolly (2007) determinó que las fermentaciones que se inician con una menor relación glucosa-fructosa ($< 0,8$) tenían mayor probabilidad de sufrir una parada fermentativa. Si bien las levaduras vínicas muestran preferencia por la glucosa, lo cual contribuye a la

acumulación de fructosa, especialmente en las últimas etapas del proceso fermentativo (Fleet, 1998). Todas las cepas conocidas de *S. cerevisiae* comparten una mayor apetencia por glucosa comparada con fructosa, relacionada con la preferencia por esta hexosa de las correspondientes proteínas transportadoras (Berthels y col, 2004).

La fermentación alcohólica implica la degradación de las hexosas por vía glucolítica hasta piruvato y, posteriormente, la actuación de piruvato decarboxilasa y alcohol deshidrogenasa, producen etanol como producto final de la fermentación, regenerando el poder reductor, en forma de NAD^+ . En la glucólisis, glucosa y fructosa comparten dicha ruta catabólica a partir de fructosa 6-fosfato.

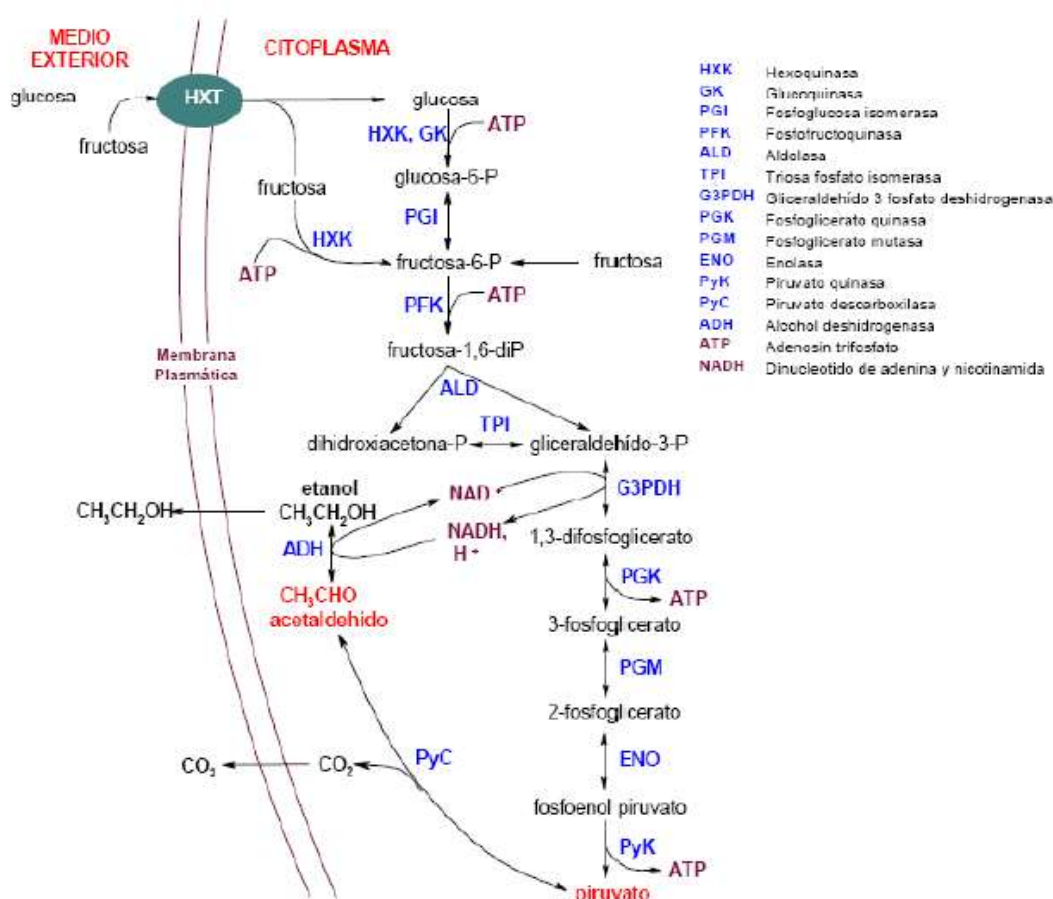


Figura nº 3 Metabolismo glucolítico de los azúcares por *Saccharomyces cerevisiae* y sistemas enzimáticos implicados (Abad Arranz, 2006).

Si la membrana es dañada durante la desecación, o si la rehidratación sucede demasiado lenta, el agua puede entrar en la célula y deteriorar sus componentes (Poirier 1999; Laroche 2003)

La glucosa tiene un efecto estabilizador sobre las membranas citoplasmáticas durante la rehidratación. Esto es necesario para reparar los daños sufridos por las membranas. La hexosa puede penetrar en la célula y promover la formación de redes proteicas reduciendo así la cinética de difusión de las sustancias intracelulares al medio (Rodríguez Porrata, 2007). Por otra parte, a altas temperaturas la glucosa puede acelerar las reacciones entre azúcares y aminos, esto produce un incremento en la permeabilidad de la membrana (Beker, 1987; Rapoport, 1995).

2.10 Ventajas de la utilización de levaduras seleccionadas

La utilización de levaduras seleccionadas en procesos de vinificación presenta ventajas frente a la fermentación espontánea tradicional (Melero, 1992):

- ✓ Mayor velocidad de fermentación. En muchas ocasiones la flora silvestre presente en los mostos no es adecuada para iniciar la fermentación con rapidez. Esto es particularmente frecuente en la elaboración de vinos blancos, donde el mosto es clarificado previamente, eliminando gran parte de la población microbiana. Por otra parte, el uso de ciertos productos fitosanitarios reduce considerablemente la población de levaduras presente en la uva, especialmente las levaduras fermentativas. Utilizando un inóculo de LSA se asegura la fermentación del mosto a una velocidad aceptable.
- ✓ Máximo consumo de los azúcares reductores. Cuando los mostos presentan una elevada concentración de azúcar (mayor de 200 g/L) o cuando se impone una cepa de levadura con insuficiente resistencia al etanol puede quedar en el vino una excesiva cantidad de azúcares reductores. Este problema se corrige fácilmente utilizando levaduras seleccionadas resistentes a altas concentraciones de etanol. Y también con el uso de levaduras con preferencia por la fructosa.
- ✓ Menor variabilidad en la calidad de los vinos. Se puede, incluso, mantener y asegurar una cierta calidad del vino de una temporada a otra muy distinta con respecto al estado fitosanitario de la uva (Querol, 1993), lo que es prácticamente imposible utilizando métodos tradicionales de vinificación.
- ✓ Reducción de los problemas causados por levaduras extrañas silvestres. La flora presente en los mostos puede ser muy diferente dentro de la misma zona vitivinícola e incluso dentro de la misma bodega, debido a factores como técnicas de vendimia, vinificación, temperatura y pluviosidad (Querol, 1993).

Como consecuencia, en cualquier momento pueden surgir levaduras extrañas silvestres que deterioren la calidad de los vinos. Con el empleo de inóculos de levaduras seleccionadas se minimiza o desaparece este riesgo.

Para que la fermentación alcohólica se inicie es necesario contar con una concentración mínima de 2×10^6 cél de levaduras/ml (Boulton et al, 1995). Esa cifra se alcanza rápidamente mediante el empleo de levaduras secas activas (LSA).

Para medir la población de células viables se emplea al recuento en placas. Este método tiene sus inconvenientes, ya que demora aproximadamente 72 horas en ofrecer resultados, por otra parte, al efectuar numerosas diluciones se presentan más oportunidades de cometer errores, ello afecta a la calidad de los datos que se obtienen de este modo.

Por estas razones, se considera necesario ensayar otros métodos de recuento, con el objeto de sustituir el recuento en placa. Alternativas posibles son la medida de la densidad óptica a 620 nm y el peso seco de la población de levaduras (Fugelsang, 1996)

3. HIPOTESIS DEL TRABAJO

La rehidratación de LSA en agua glucosada permite obtener mayor cantidad de población y mayor velocidad de fermentación (con respecto a la rehidratación en agua)

Para probar esta hipótesis se postularon los siguientes objetivos:

3.1 OBJETIVOS

- Objetivo general: Evaluar el efecto del uso de agua glucosada en la rehidratación de las LSA sobre la población obtenida y la cinética de fermentación en jugo de uva.
- Objetivos particulares:
 - Evaluar la velocidad de fermentación en mostos inoculados con levaduras rehidratadas en diferentes concentraciones de glucosa.
 - Determinar la concentración de glucosa óptima que permita expresar la mayor concentración de población y velocidad de fermentación.
 - Poner a punto un método para evaluar la población, relacionando el peso seco con la densidad óptica a 620 nm y recuento de viables.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Tratamientos

Se realizó el experimento con 3 tratamientos de diferentes concentraciones de glucosa: Testigo 0 g/l (T1); 100 (T2) y 250 (T3) g/l, cada uno por triplicado.

4.2 Microorganismos utilizados

Como LSA se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* cepa BO 213 (actiflore Bayanus, Laffort Oenologie Argentina S.A), las levaduras que se inocularon al testigo se rehidrataron según protocolo del fabricante; las que se agregaron a los tratamientos 2 y 3 también se rehidrataron de acuerdo al protocolo pero se agregó glucosa en las concentraciones indicadas.

4.3 Procedencia del Jugo de uva

Se trabajó en un mosto “Torrontés”, del departamento de Guaymallén. El mismo presento 230 g/L de azúcares reductores, pH 3,3 y fue ajustado con 50 ppm de SO₂ total

4.4 Preparación del trabajo

Se sembraron, para los 3 tratamientos, 2×10^6 células/ml, realizando el recuento en cámara de Neubauer (figura 4), en erlenmeyers que contenían 100 ml de mosto (figuras 5 y 6) y fueron incubados durante 12 días a $18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Se debe tener en cuenta que cada tratamiento se realizó por triplicado.



Figura n°4 Cámara de Neubauer (www.pro-lab.com.mx)



Figuras n°5 y n°6 Erlenmeyer inoculados con LSA rehidratadas en agua glucosada

- 4.4.1 *Cinética de fermentación:* El ensayo constó de 3 tratamientos con 3 repeticiones, total de 9 erlenmeyers. éstos presentaban un tapón de goma con un tubo de vidrio y algodón (figura 7) para facilitar el desprendimiento de CO₂. La pérdida de peso fue registrada diariamente hasta peso constante para graficar las curvas de fermentación y evaluar la velocidad de fermentación.



Figura n° 7 Erlenmeyer para control de perdida de CO₂

4.4.2 Control de población viable:

4.4.2.1 *Recuento de microorganismos:* El ensayo constó de 3 tratamientos con 3 repeticiones, total de 9 erlenmeyers a los cuales diariamente se le hizo extracción para recuento. El medio en el que se hicieron crecer los microorganismos fue caldo extracto de levadura peptona dextrosa (YEPD). Para la elaboración del caldo se utilizó extracto de levadura 1%, Peptona 2% y Glucosa 2%. Las cajas de Petri fueron divididas en 6 secciones para sembrar las distintas diluciones que se realizaron a medida que transcurría el tiempo por multiplicación de levaduras. (Figura 8). Una vez plaqueadas, se colocaron en estufa a 30°C por 72 horas. Se registraron diariamente las unidades formadoras de colonias.

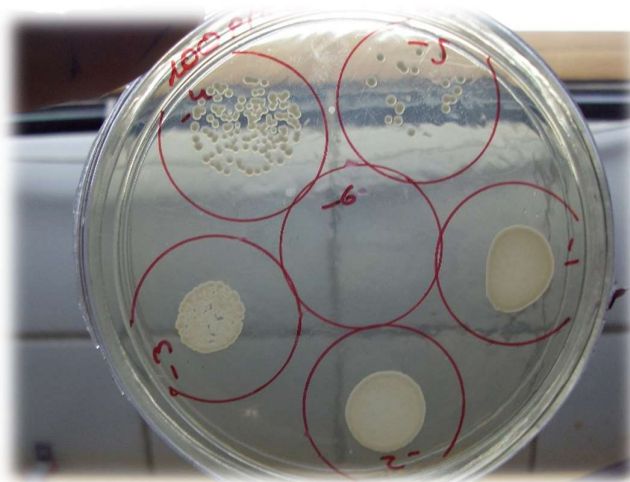


Figura n°8 Caja de Petri con colonias de levaduras

4.4.2.2 *Peso Seco:* Se trató de un ensayo destructivo, por ello se planteó para 12 días de fermentación de los 3 tratamientos con 3 repeticiones, total 108 erlenmeyers y diariamente se eliminaban 9. Se filtraron 50 ml de los Erlenmeyer destinados a este control (Figura 9) en filtro de papel en embudo y posteriormente se hicieron pasar por bomba de vacío en membrana 0,45 μ . Las membranas fueron

incubadas en estufa a 30 °C durante 24 horas y se registró el peso en balanza analítica.



Figura n° 9 Batería de Erlenmeyer en primera filtración y bomba de vacío

4.4.2.3 *Determinación de biomasa por espectrofotometría:* se utilizaron los 50 ml restantes del control anterior para densidad óptica a 620 nm, en la que se realizaron, en caso de ser necesarias, diluciones y fue registrada la absorbancia hasta el final de la fermentación.

4.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados empleando el análisis de la varianza y regresión simple lineal por medio del programa Excel e Infostat.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo la metodología descrita en el punto 4.4.1, se estudiaron las pérdidas de CO₂ para los 3 tratamientos y 3 repeticiones.

En la siguiente tabla puede observarse el desprendimiento de CO₂ acumulado durante los días de fermentación para 100 ml de mosto.

Tabla N°1: Desprendimiento acumulado (gr) de CO₂

Tratamiento	CO ₂ acum. (gr)
Testigo	11,658 ^(a)
100 gr/l	9,452 ^(b)
250 gr/l	12,080 ^(c)

Cada dato representa la media de 3 repeticiones

Letras distintas indican diferencia significativa

El gráfico n°1 representa la tabla anteriormente observada, en la cual puede verse que el tratamiento 3 (250 gr/l) es el que más perdió peso 12,080 gr y el T2 (100gr/l) sólo 9,452 gr, mostrando al T1 con una pérdida de 11,658 gr, en 100 ml de mosto en fermentación.

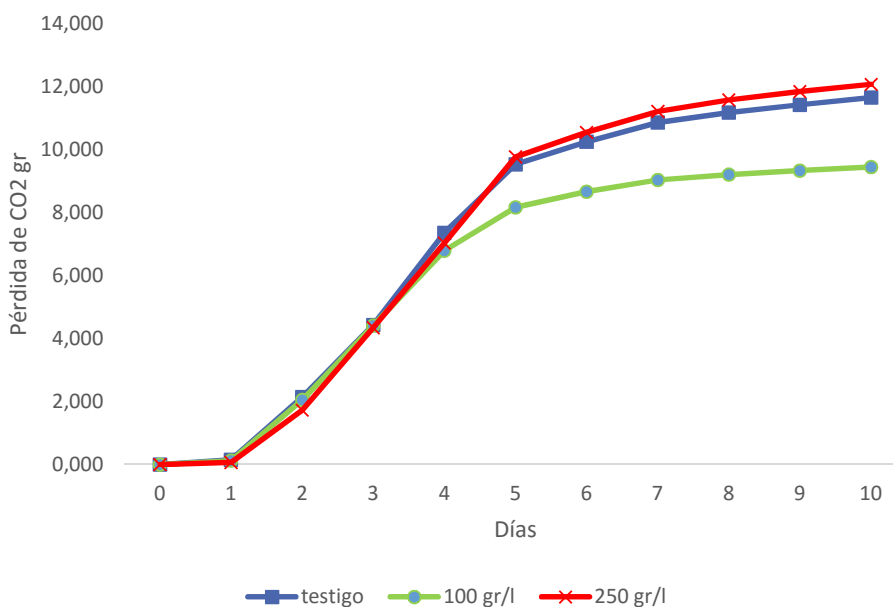


Gráfico n°1: Pérdida de CO₂ (gr) acumulado

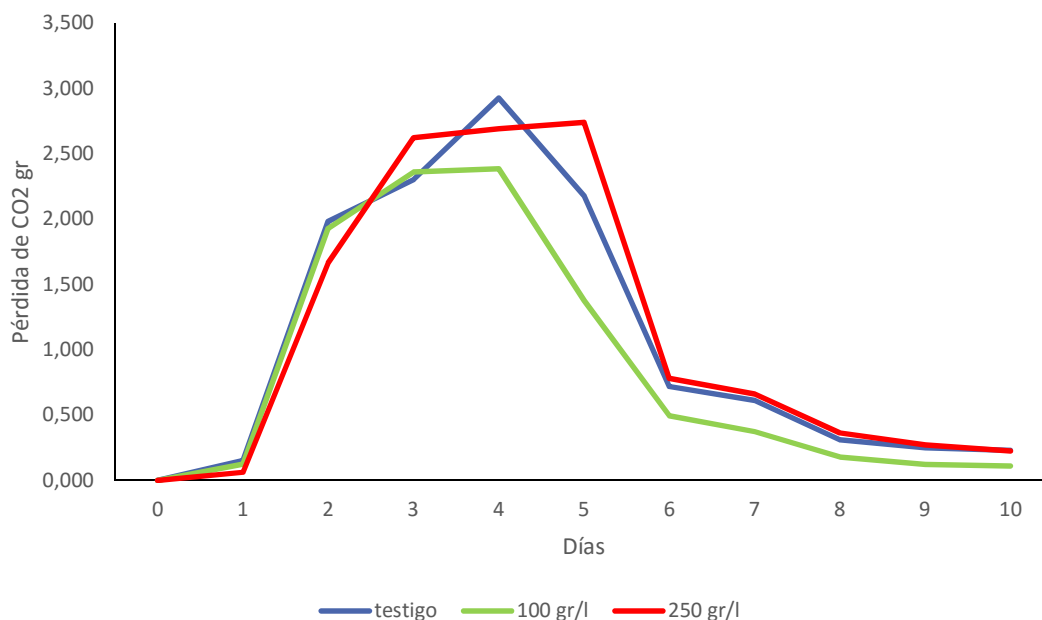


Gráfico n°2: Cinética de fermentación

Se observa que en el testigo el desprendimiento máximo de anhídrido carbónico se logra al cuarto día, mientras que en el tratamiento de 100 gr/l el máximo se consigue el tercer día; en el caso de 250 gr/l se observa una meseta que va desde el tercer al quinto día con intenso desprendimiento de CO₂.

A continuación se comparan los tratamientos según su velocidad de fermentación. Para ello se ajustó una función lineal y la misma se derivó para obtener la velocidad

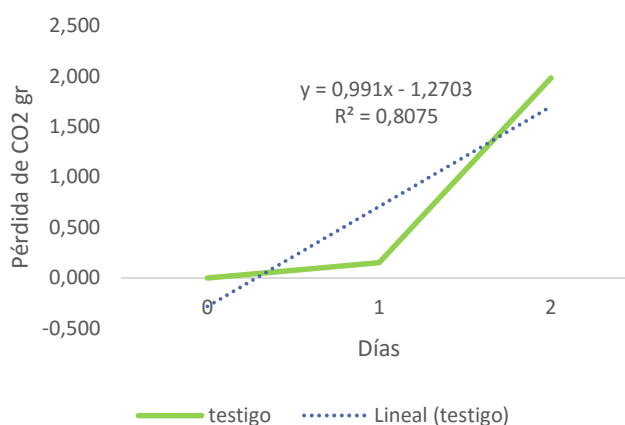


Gráfico n°3: Velocidad de pérdida de CO₂ en los primeros días de fermentación – Testigo

$$y = 0,991x - 1,2703$$

La derivada primera de esta función resulta ser la velocidad que corresponde a 0.991 gr CO₂/100ml de mosto/día

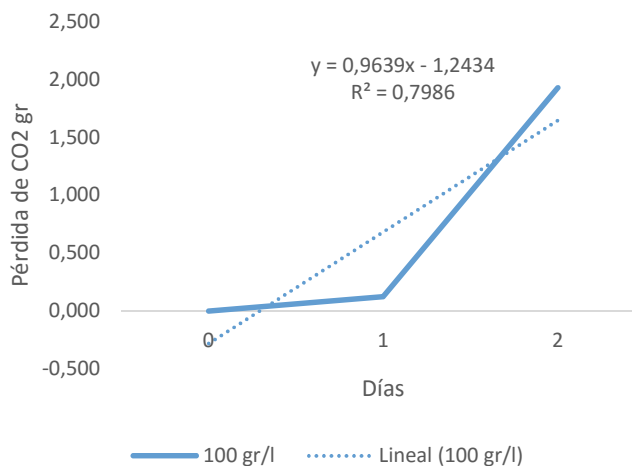


Gráfico n°4: Velocidad de pérdida de CO₂ en los primeros días de fermentación - T2 (100 gr/l)

$$y = 0,9639x - 1,2434$$

La derivada primera de esta función resulta ser la velocidad que corresponde a 0.963 gr CO₂/100ml de mosto/día

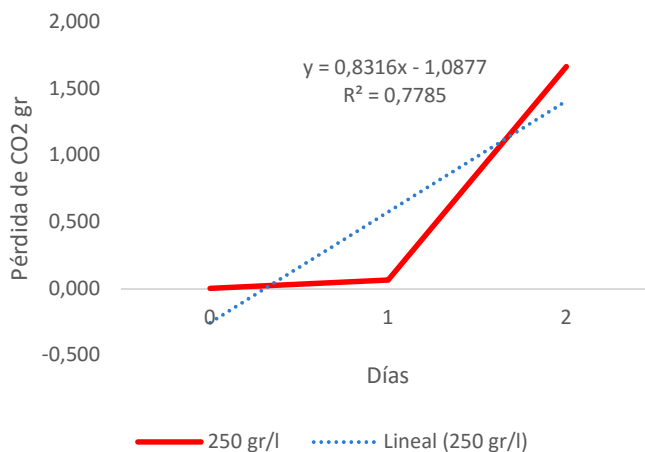


Gráfico n°5: Velocidad de pérdida de CO₂ en los primeros días de fermentación - T3 (250 gr/l)

$$y = 0,8316x - 1,0877$$

La derivada primera de esta función resulta ser la velocidad que corresponde a 0.831 gr CO₂/100ml de mosto/día

La velocidad de fermentación es muy similar en el tratamiento de 100 gr/l y el testigo pero es notablemente menor cuando la concentración es de 250 gr/l.

Si bien durante todo el proceso de fermentación el tratamiento con 250 g/l de glucosa es el que presenta la mayor viabilidad de levaduras, durante la fase de latencia es el más lento para comenzar. Siendo el testigo, rehidratado en agua pura, el que primero comienza la fermentación, y es el que se mantiene durante todos los días casi a la par al tratamiento 3 (250g/l). Rodriguez Porrata, 2010 asegura que las células rehidratadas con glucosa muestran un ligero aumento de la vitalidad respecto a las rehidratadas en agua pura, pudiendo en la presente tesis corroborar dicha hipótesis, evaluando la fermentación completa.

Población viable

Siguiendo el apartado 4.4.2. Los datos obtenidos del recuento de células viables se analizaron por medio de análisis de la varianza, los resultados se presentan a continuación

Tabla N°2: Recuento de células viables en los días 4 5 y 6

Día	Testigo	100 gr/l	250 gr/l
4	34E+06 _(a)	26E+06 _(b)	24E+06 _(c)
5	38E+06 _(a)	30E+06 _(b)	26E+06 _(c)
6	26E+06 _(a)	45E+06 _(b)	27E+06 _(c)

Cada dato representa la media de 3 repeticiones. Letras diferentes significan diferencias significativas

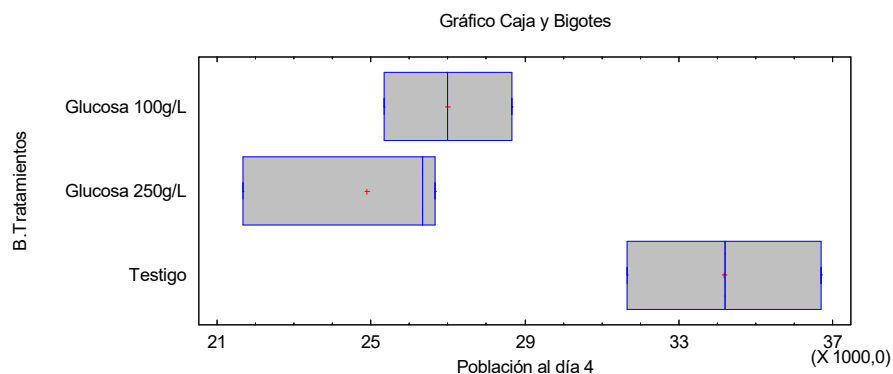


Gráfico n°6: Diagrama de caja para la población viable los 3 tratamientos al cuarto día

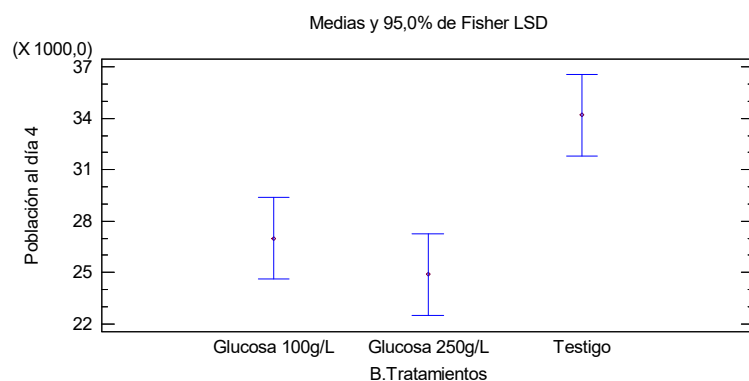


Gráfico n°7: Medias de la población viable de los 3 tratamientos al cuarto día

Al 4° día la población del testigo es la mayor y es distinta de los dos tratamientos con glucosa, que no presentan diferencias entre sí.

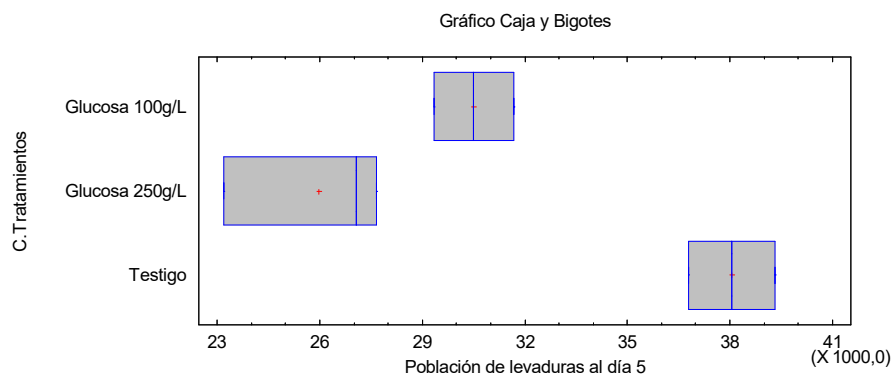


Gráfico n°8: Diagrama de caja para la población viable de los 3 tratamientos al quinto día

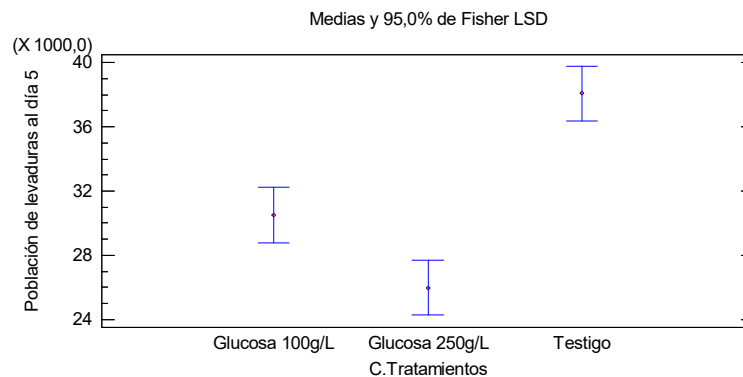


Gráfico n°9: Medias de la población viable de los 3 tratamientos al quinto día

Al 5° día la población de los tres tratamientos es diferente, siendo el testigo el que presenta mayor población, luego el tratamiento 100g/L y finalmente el de 250g/L tiene la menor población.

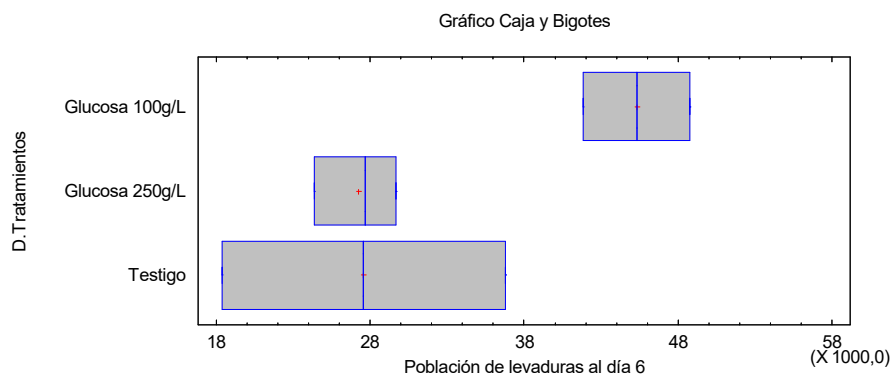


Gráfico n°10: Diagrama de caja para la población viable de los 3 tratamientos al sexto día

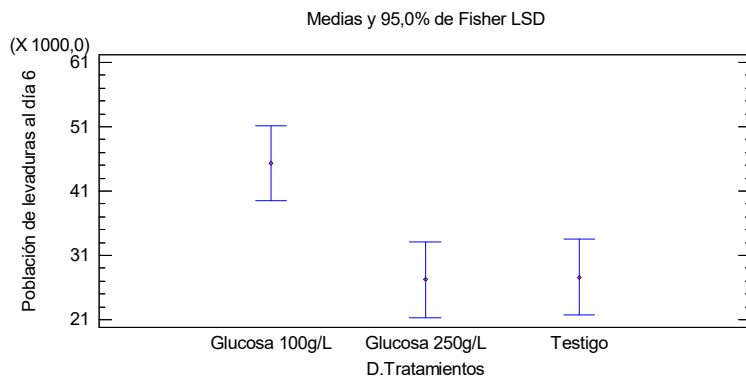


Gráfico n°11: Medias de la población viable de los 3 tratamientos al sexto día

Al 6° día el tratamiento 100g/L es el que presenta la mayor población, la cual es diferente del testigo y el tratamiento glucosa de 250 g/L, podría suponerse que hay una mayor conservación de la población que en los otros tratamientos.

Se realiza un análisis de correlación entre los distintos métodos para el control de células viables.

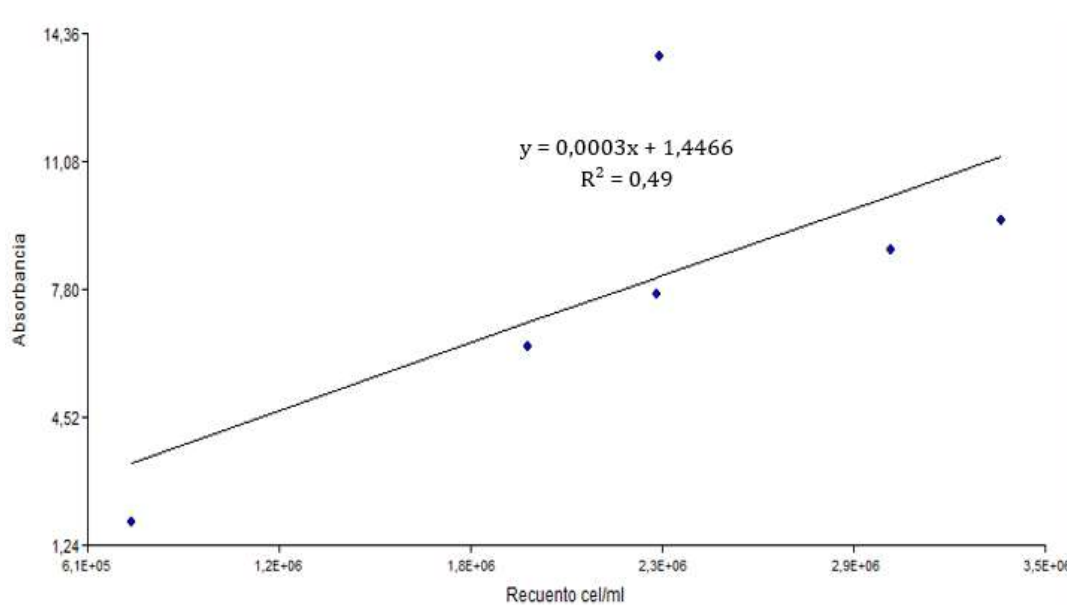


Gráfico n°12: Regresión simple lineal, Testigo

El gráfico n°12 muestra que existe una leve relación entre el recuento de levaduras y absorbancia en la muestra testigo, presentando un R^2 de 0,49.

El R^2 es relativamente bajo ya que la variable absorbancia explica menos del 50% de los casos. Tal vez se puede adjudicar a la variabilidad que habitualmente presenta el método de recuento total para considerar las unidades formadoras de colonias.

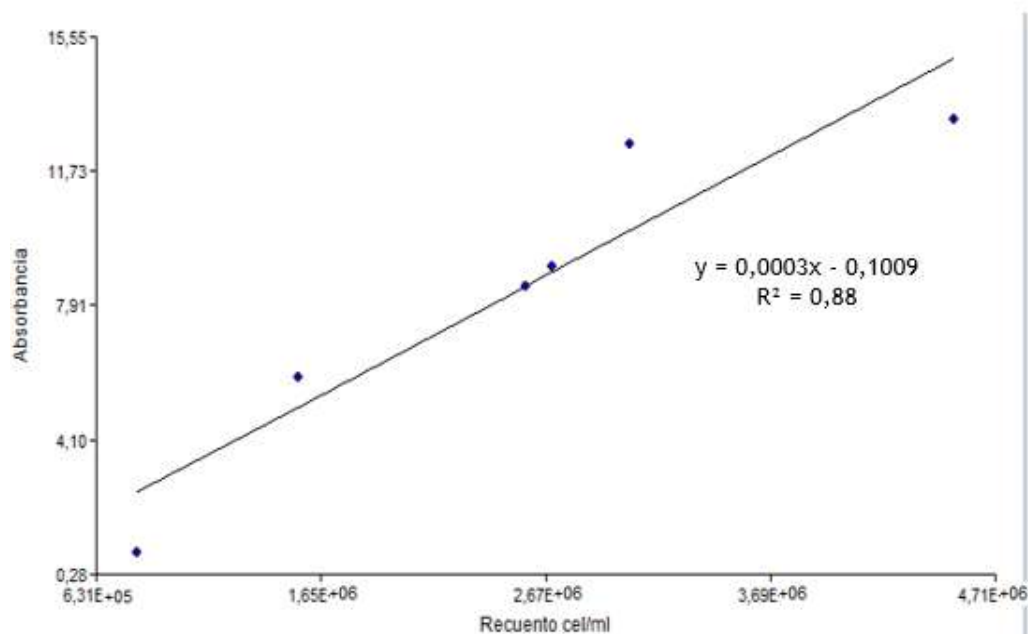


Gráfico n°13: Regresión simple lineal, tratamiento 2

El tratamiento 2 muestra un R^2 más elevado (0,88), lo que indica que hay una relación más fuerte entre el recuento de levaduras y absorbancia para este tratamiento

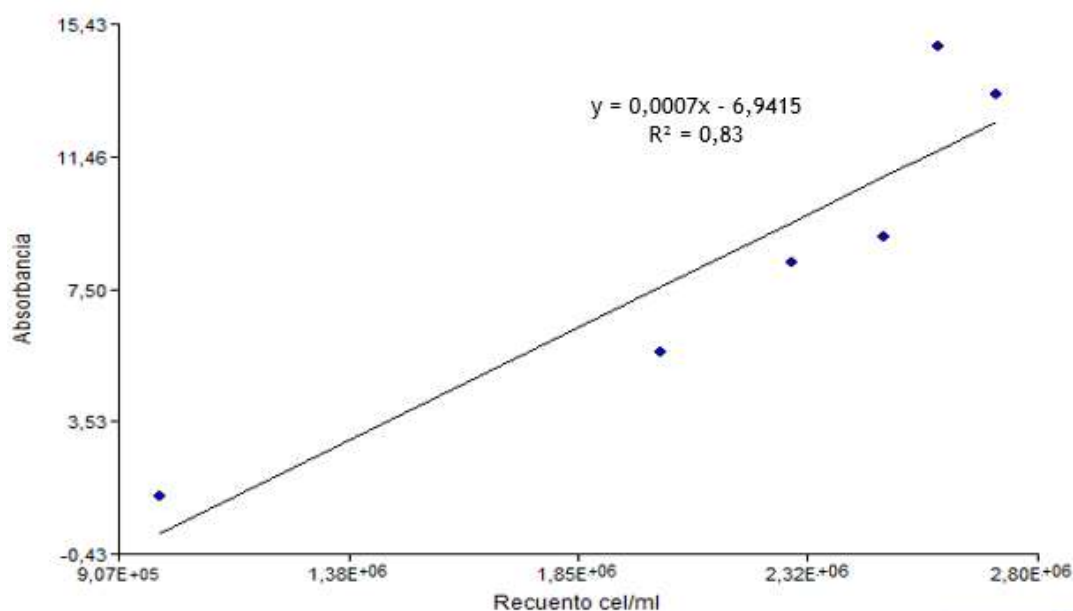


Gráfico n°14: Regresión simple lineal, tratamiento3

En el tratamiento 3 (Gráfico n°14) puede observarse que también existe una relación fuerte entre ambas variables ($R^2= 0,83$).

No pudo relacionarse el peso seco con la densidad óptica y recuento de viables, debido a una falla metodológica. En todos los casos en que se usa el peso seco y la densidad óptica para estimar la población se ha hecho en medio sintético, totalmente límpido. Al utilizarse mosto sin tindalizar, la membrana se saturó al comienzo de la filtración, por lo que se realizó una primera filtración en papel, como se mencionó en el apartado 4.4.2. Al realizar este paso, se supone que se han perdido muchas levaduras. Por lo que los resultados obtenidos no tienen coherencia. El mosto de uva es muy difícil de filtrar ya que contiene abundantes gomas y mucilagos.

6. CONCLUSIÓN

El agregado de glucosa en la solución de rehidratación presenta diferencias con respecto al uso de agua, como se hizo en el testigo.

En cuanto a la velocidad de fermentación el testigo supera los tratamientos con glucosa.

Al quinto día de fermentación el testigo presenta mayor población y al sexto día de fermentación los tratamientos con glucosa superan en población al testigo.

El agregado de azúcar deberá ser reconsiderado en otras condiciones de trabajo, y podría asociarse a la adición de otros aditivos y en otras concentraciones.

7. Bibliografía

- Abad Arranz E. 2006. Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y viñedos de Trujillo S.L. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid, España 115 p.
- Alegre, M. T.; Rodríguez, M. C.; Mesas, J. M. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol. 2 No. 4, p. 174-183 Ed. Altaga.
- Aranda, A., Matallana, E. y del Olmo, M. 2005. Levaduras. *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación. In *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V., Muñoz, R., y González, R. p 19-56.
- Baney L, Marechal PA, y Gervis P 2001. Coupling effects of osmotic pressure and temperatura on the viability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbio Biotechnol*, 56, 513 – 516.
- Barrajón Simancas, N; Martin de Vidales Calvo; Alonso Infante, Briones Perez. 2007. Éxitos y fracasos en la inoculación de levaduras seco activas en bodegas de Castilla La Mancha. Cuadernos de estudios manchegos, Universidad de Castilla La Mancha. I.S.S.N.: 0526-2623. 17 p.
- Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. 1990. Yeasts: characteristics and identification. (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge. 1002 p.
- Bauer, F. F. y I. S. Pretorius. 2000. *Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review*. S. Afr. J. Enol. Vitic.. 21:27-51.
- Beker MJ, Blumbergs EJ, Ventina EJ y Rapoport AI. 1984. Characteristics of celular membreanes at rehydrated of rehydration of dehydrated yeasr *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnonology*, 19, 347 – 352.
- Bernardi. 2013. Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza. universidad Nacional de Cuyo. p 5 – 21.
- Berthels, N. J.; Cordero Otero, R.; Bauer, F. Thevelein, J.; Pretorius, I. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Sacharomyces cerevisiae* wine yeast strain. *FEMS Yeast Research*. N° 4, p 683-689.

- Boulton, R. B., V. L. Singleton, L. F. Bisson, y R. E. Kunkee. 1995. *Principles and practices of winemaking*. 1996. The Chapman & Hall Enology Library, New York.
- Boulton R.B., Singleton V.L, Bisson L.F, and Kunkee R.E. *Teoría y Practica de la elaboración del vino*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
- Castino M. (1994). *Vino bianchi tecnologia di produzione*. Ed. Agricole Edizione Agricole, Bologna.
- Combina, M.; Elia, A.; Mercado L.; Catania, C.; Gangac, A.; Martinez, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. N° 99, p 237– 243.
- Degreé R. 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine microbiology and biotechnology*. Editado por Graham H. Fleet. Harwood Academic Publishers, 421-447.
- Díaz-Patiño. Tesis doctoral 2013. Rehidratación de levaduras vínicas con activadores metabólicos: influencia en la cinética fermentativa y fisiología celular. Universidad de Castilla – La Mancha. p 11-28
- Flanzy, Claude. 2003. *Enología: Fundamentos Científicos y tecnológicos*. 1° Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. p 783.
- Fleet GH y Heard G.M 1993. Yeast growth during fermentation. En: *Wine microbiology and biotechnology*. Editado por Graham H. Fleet. Harwood Academic Publishers, 27-57.
- Fleet GH 1998. The microbiology of alcoholic beverages. En: Wood BJB (ed) *Microbiology of fermented foods*. Blackie, Glasgow, p 217-262.
- Formento, J. C.; Lúquez, C.; Sánchez, L.; Galiotti, H.; Sfreddo, E; Nazralla, F.; Bernardi, M.; Genovart, J.; Riveros, R.; Figueroa, C. 2011. Selección de Levaduras Enológicas Autóctonas de las Regiones Vitivinícolas de Mendoza. Nuevo Procedimiento de Búsqueda y Selección en las Yemas de Vid. *III Jornadas Nacionales de Biología y Biotecnología de Levaduras*, Mendoza, 30 junio-1 julio de 2011 / compilado por Mariana Combina. - a ed. - Buenos Aires : Ediciones INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA Mendoza., 2011. CD-ROM. ISBN 978-987-679-024-6. 1. Biotecnología. 2. Vid. I. Combina, Mariana, comp. CDD 630.
- Formento, JC; Ercoli, E.; Díaz Peralta, E.; Nazralla, J.; Galiotti, H.; Sfreddo, E. Paladino, S.; Sánchez, M.L.; Maza, M. Y Benvenuto, M. 2009. Aislamiento,

- selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas de las regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza. 3º etapa: departamento Rivadavia. Subsidio: Evaluado, aprobado y subsidiado por SECYT- UNC: 882/07-R 2007-2009
- Frick, O. y Wittmann, C. 2005. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microb Cell Fact* **4**: 30.
 - Fugelsang KC 1997. Wine microbiology. The Chapman and Hall Enology Library. Chapter 5, 132-142. (ISBN. 0-412-06611-4).
 - Garré Gracia. 2008. Caracterización y mejora de la resistencia de las levaduras vínicas a la rehidratación en la producción de levadura seca activa. Univesitat de Valencia. Servei de publicacions
 - Gil J.V., Mateo J.J., Jiménez M., Pastor A. y Huerta T. 1996. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeast. *J. Food Sci.*, 61 (6): 1247.
 - González, R., Muñoz, R. y Carrascosa, A.V. 2005. Producción de cultivos iniciadores para elaborar el vino. In *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V., Muñoz, R., y González, R. (eds). AMV Ediciones, pp. 318-341.
 - Heard G.M y Fleet G.H. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 727-728.
Profesional, 43: 50-56.
 - Heard G.M y Fleet G.H. 1986. Ocurrance and growth of yeast during the fermentation of some australian wine. *Food Technol. Aust.*, 38(1):22-25.
 - Lema C., López J.E., Sanroman J.A., y Angulo L. 1996. Influencia del tipo de siembra en el desarrollo de las poblaciones de levaduras durante la vinificación: efecto en la composición química y calidad de vinos albariño. *Viticultura y Enología*, 43: 50-56.
 - Jolly N 2007. The use of fructophilic yeast for a co- inoculated fermetation of grape juice. Paper: 8th international Symposium of innovation in Enology, 22-23 april 2007, Messe - Kongresszentrum, Stuttgart- Killesberg, Germany.
 - Jorgensen, H., Olsson, L., Ronnow, B. y Palmqvist, E.A. 2002. Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 310-317.

- Lambrese 2012. Estudios metabólicos y de conservación en levaduras para vinificación. Tesis ingeniería en alimentos. p 6 – 28.
- Laroche, C. y Gervais, P. 2003. Achievement of rapid osmotic dehydration at specific temperatures could maintain high *Saccharomyces cerevisiae* viability. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 743-747.
- LLANOS, M. 2003. Selección y producción de levaduras vínicas. *La semana vitivinícola*. N° 2959, p 1302-1308.
- Mas, A.; Torija, M. J.; Beltran, G.; Novo, M.; Hierro, N.; Poblet, M.; Rozés, N.; Guillamón, J. M. 2006. Selección de levaduras. Tecnología del vino. N° 02, Marzo-Abril, p 39-44.
- Melero R. 1992. Fermentación controlada y selección de levaduras vínicas. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, 32 (4):371-379.
- Mercado, L.; A, Dalcer, A.; Masueli, R.; Combina, M. 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*. N° 24 p. 403–412.
- Monk PR 1986. Rehydration and propagation of active dry wine yeas. *Aust. Wine Ind. J.*, 1 (1) 3 – 5.
- Navarre, C. 1994. *L'oenologie*. 4ª ed. Ed. Lavoisier Tec. & Doc., París.
- Pérez-Torrado, R, 2004. Estudio y mejora del proceso de producción industrial de levaduras vínicas. Universitat de Valencia. Tipo de referencia: Tesis.
- Ough, C.S. (1992) *Winemaking Basics*. The Haworth Press, Inc.
- Poirier, I., Marechal, P.A., Richard, S. y Gervais, P. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *J Appl Microbiol* **86**: 87-92.
- Querol A., Barrio E., Huerta T. y Ramon D. 1992b. Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wine: selection and DNA patterns. *J. Food Sci.*, 57:183-185
- Querol A., Barrio E., Huerta T. y Ramon D. 1993. "Utilización de técnicas moleculares para la caracterización de levaduras vínicas y el estudio del proceso de vinificación". *Microbiología SEM*, 9:76-82.
- Reed G. y Nagodawithana T.W. 1988. Technology of yeast usage in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39(1): 83-90.
- Rapoport AI, Khrustaleva GM, Chamanis GY, Beker ME 1995. Yeast anhydrobiosis – permeability of the plasma – membrane, *Microbiology*, 64 (2) 229 – 232.

- Regodón J.A. 2004. Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Universidad de Extremadura. p 20–26.
- Ribéreau – Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B y Lonvaud A 2001. Cytology, Taxonomy and Ecology of grape and wine yeast. The microbiology of wine and vinifications. Ribéreau – Gayon, P (ed). Wiley, p 1 – 50.
- Rodríguez Porrata B. 2007. Mejora del proceso de rehidratación de la levadura seca activa en enología. Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas. Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al Sector vitivinícola. p 52.
- Rodríguez Porrata B, novo M, Guillamón J, Rozés N, Mas A y Cordero Otero. 2008. Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. International Journal of food microbiology, 126, 116-122.
- Rodríguez Porrata B, Lopez Martinez G, Redon M, Sancho M, Mas A, Rozés N, Cordero Otero R. 2010. Enhancing yeast cell viability after dehydration by modification of the lipid profile. World Journal of Microbiology and biotechnology, 27 (1) 75 – 83)
- Sánchez, M. L.; Sfreddo, E.; Paladino, S.; Maza, M.; Formento, J.C.; Farrando, S.; Bernardi, M.; Vargas, E. 2010. Creación de un cepario de levaduras vínicas. *Revista Argentina de Microbiología*. Supl. 1. Vol. 42, pág. 195
- Suárez J.A. E Iñigo B. 1992. *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación*. Ediciones Mundi-Prensa.Madrid. 2ª Edición.
- Suárez, J. A. 1997. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Trione, D. 1989. Selección y elección de levaduras para los vinos tintos. III Seminario de actualización enológica.
- Walker GM 1998. Yeasst. Physuology and Biotechnology. (ed) Wiley. p 19 -21.
- Wang, X.D., Bohlscheid, J.C. y Edwards, C.G. 2003. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 349-359.
- Zuzuarregui, A, 2005. Caracterización fisiológica y molecular de cepas vinicas de *Saccharomyces* sp. influencia en su comportamiento durante la vinificación. Universitat de Valencia.